

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-303990

(43)公開日 平成6年(1994)11月1日

| (51)Int.Cl. ⁵ | 識別記号 | 庁内整理番号 | F I | 技術表示箇所 |
|--------------------------|------|------------------|---------------|--------|
| C 1 2 P 21/08 | | 8214-4B | | |
| C 1 2 N 5/20 | | | | |
| 15/06 | | | | |
| | | 8412-4B | C 1 2 N 5/ 00 | B |
| | | 9050-4B | 15/ 00 | C |
| | | 審査請求 未請求 請求項の数 4 | F D (全 5 頁) | 最終頁に続く |

(21)出願番号 特願平5-120956

(22)出願日 平成5年(1993)4月24日

特許法第30条第1項適用申請有り 平成4年10月30日、
日本免疫学会は発行の「日本免疫学会総会記録第22巻」
に発表

(71)出願人 000000952

鐘紡株式会社

東京都墨田区墨田五丁目17番4号

(72)発明者 西田 佳代

東京都豊島区東池袋2丁目21番6-907号

(72)発明者 西田 正

東京都豊島区東池袋2丁目21番6-907号

(72)発明者 蓮沼 行人

兵庫県神戸市東灘区向洋町中1丁目10番
101-702号

(72)発明者 関根 知世子

東京都江東区木場5丁目6番36-604号

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 モノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法

(57)【要約】

【構成】 ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法。

【効果】 本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中のヒトインテグリン β_7 を容易に検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中からヒトインテグリン β_7 を分離精製することができる。従って、本発明のモノクローナル抗体はヒトインテグリン β_7 の検出試薬や分離精製用試薬として有用である。更に、本発明のモノクローナル抗体はヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することから、フィブロネクチン等の細胞接着蛋白と関連する、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待される。

AP2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体。

【請求項2】 請求項1に記載の抗体を産生するハイブリドーマ。

【請求項3】 抗ヒトインテグリン α_4 抗体と抗ヒトインテグリン β_1 抗体とを用いて、ヒトメモリーT細胞、ヒト単球およびヒトB細胞リンパ腫のなかから選択されるヒトリンパ細胞から、フローサイトメトリー分析法により、ヒトインテグリン α_4 を発現しているがヒトインテグリン β_1 を発現していない細胞を選出した後、該細胞の可溶化溶液を抗ヒトインテグリン α_4 抗体を固定化したイムノアフィニティカラムに付してヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを得、次にこれを抗原として哺乳小動物を免疫した後、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製し、該抗体産生脾細胞と骨髓腫細胞とを細胞融合してハイブリドーマを調製し、該ハイブリドーマが産生するモノクローナル抗体をフローサイトメトリー分析法によりスクリーニングしてヒトインテグリン α_4 を認識せずにヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別し、該ハイブリドーマを、これと適合性のある哺乳小動物の腹腔内に接種して増殖させ、該腹水から生成したモノクローナル抗体を分離精製することを特徴とするヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体の製造方法。

【請求項4】 ヒトB細胞リンパ腫がRPMI 8866である請求項3に記載のモノクローナル抗体の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明はヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法に関する。

【0002】

【従来の技術】インテグリン α_4 β_1 (VLA-4) は単核白血球の大部分に発現しており、細胞接着蛋白の一つであるVCAM-1との結合を介して炎症部位に浸潤し、炎症反応を起こす。従って、喘息、アレルギー、関節炎および動脈硬化症のような疾患においては、VLA-4とVCAM-1との接着を阻害することが治療上重要であると考えられている(Bosco M. C. Chanら、J. Biol. Chem.、第267 巻、8366頁、1992年)。

【0003】VLA-4はインテグリン β_1 サブファミリーに属し、その構成はインテグリン α_4 とインテグリン β_1 のヘテロダイマーから成る。しかし、このインテグリン α_4 サブユニットはインテグリン β_1 のみならず、ヒトではインテグリン β_7 とも会合することが報告されている(Bosco M. C. Chanら、J. Biol. Chem.、第267 巻、8366頁、1992年およびDavid J. Erle ら、J. B

iol. Chem.、第266 巻、11009 頁、1991年)。

【0004】ヒトインテグリン α_4 β_7 はヒトインテグリン α_4 β_1 と同様、フィブロネクチンやVCAM-1を介して内皮細胞にリンパ球を接着させるという報告もある(Curzio Rueggら、J. Cell Biol.、第117 巻、179 頁、1992年)。

【0005】従来、インテグリンサブユニットに対する種々の抗体が知られているが、ヒトインテグリン β_7 に対するモノクローナル抗体は、知られていなかった。

10 【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明はヒトインテグリン β_7 と特異的に結合できるモノクローナル抗体、それを産生するハイブリドーマおよび該抗体の製造方法を提供することを目的とする。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、種々検討した結果、ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体およびヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを見だし、本発明を完成させた。

20 【0008】以下、本発明を詳細に説明する。

【0009】本発明のモノクローナル抗体およびそれを産生するハイブリドーマは、以下の製造方法によって得ることができる。

(抗原の調製)本発明では、哺乳動物への免疫に用いる抗原には、精製したヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを用いる。

【0010】ヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーは、以下のようにして得ることができる。

30 【0011】まず、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/17、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)と抗ヒトインテグリン β_1 抗体(SG/19、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)とを用いて、ヒトメモリーT細胞、ヒト単球およびヒトB細胞リンパ腫のなかから選択されるヒトリンパ細胞から、フローサイトメトリー分析法により、ヒトインテグリン α_4 を発現しているがヒトインテグリン β_1 を発現していない細胞を選出する(選出された細胞は、ヒトインテグリン α_4 サブユニットとヒトインテグリン β_7 サブユニットとがヘテロダイマーを構成していると考えられる)。次いで、選出された細胞を非イオン性の界面活性剤が含まれる可溶化バッファーで可溶化し、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/17)を固定化したイムノアフィニティカラムに通してヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを該カラムに吸着させた後、酸で溶出し、ヒトインテグリン α_4 β_7 のヘテロダイマーを含む画分を得る。最後に、得られた画分を蒸留水にて一夜透析した後、凍結乾燥する。

40 【0012】上記のフローサイトメトリー分析法によって選出された細胞としては、ヒトB細胞リンパ腫であるRPMI 8866(順天堂大学医学部免疫学教室から入

手)が例示される。

【0013】(ハイブリドーマの製造)ハイブリドーマの製造は、常法に従って次のようにして行うことができる。即ち、上記のようにして得られるヒトインテグリン $\alpha_4\beta_7$ の凍結乾燥品(抗原)をリン酸緩衝生理食塩液に溶解し、これをハムスター等の哺乳小動物に投与して該動物を免疫した後、その脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製する。

【0014】免疫された動物の抗体産生脾細胞は骨髓腫細胞と細胞融合されるが、用いる骨髓腫細胞は、例えば、マウス由来のものが好ましい。細胞融合は、例えば、ミルステインらの方法(C. Milstein ら、Nature、第256 巻、495 頁、1975年)に準じて行われる。即ち、30%~60%ポリエチレングリコール(平均分子量1000~4000)を用いて30℃~40℃の温度で約1~3分反応させることによって行われる。

【0015】このようにして得られるハイブリドーマが、産生するモノクローナル抗体を、フローサイトメトリ分析によりスクリーニングを行い、ヒトインテグリン α_4 を認識せずにヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを選別する。

【0016】上記により得られたハイブリドーマは、「抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した[受託番号、微工研菌寄第13202号(FERM P-13202)]。

【0017】(モノクローナル抗体の製造)本発明のモノクローナル抗体は、上記により得られるハイブリドーマを、これと適合性のある哺乳小動物、例えば、マウス等の腹腔内に接種し、増殖させ、その腹水から本発明のモノクローナル抗体を常法により分離精製することによって得られる。

【0018】ハイブリドーマとして「抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」を用いることにより、本発明のモノクローナル抗体(TN114)が得られる。

【0019】

【発明の作用効果】本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中のヒトインテグリン β_7 を容易に検出することができる。また、本発明のモノクローナル抗体を用いることにより、ヒト組織中からヒトインテグリン β_7 を分離精製することができる。従って、本発明のモノクローナル抗体は、ヒトインテグリン β_7 の検出試薬や分離精製用試薬として有用である。

【0020】更に、本発明のモノクローナル抗体(TN114)はヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することから(試験例1参照)、フィブロネクチン等の細胞接着蛋白と関連する、炎症性疾患の治療薬としての応用が期待され

る。

【0021】試験例1

抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体による、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着の抑制作用:

(1)検体

・本発明のモノクローナル抗体(TN114、実施例2参照)

【0022】(2)試験方法

10 96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに、リン酸緩衝生理食塩液(pH7.4、以下PBSと略記する)に溶解したヒト血漿フィブロネクチン(GIBCO製)10 μ g/mlを50 μ lずつ分注し、4℃で一晩培養した。各ウエルの溶液を除去し、PBSで洗浄後、1%ウシ血清アルブミンを含有するPBSで2時間ブロッキングを行った。その後、PBSで3回洗浄し、ウシ血清アルブミンを除去した。

【0023】他方、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)を10 μ Mの2',7'-ビス(カルボキシエチル)カルボキシフルオロセイントラアセトキシメチルエステル(以下BCECF-AMと略記する)のジメチルスルホキシド溶液(同仁化学製)と共に30分間培養した後、無血清リンパ球培地(AIM VTM培地、GIBCO製)で3回洗浄した。得られたBCECF-AMを取り込ませたヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)と検体とを予め30分間培養後、先の96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに分注した(各ウエル当たり、該細胞:1 \times 10⁵個、検体濃度:20 μ g/ml)。37℃で10分間培養した後、各ウエルをPBSで満たし、プレートシール(大日本製薬製)で密閉した。該プレートを逆さにして800回転/分で2分間遠心回転を行った。各ウエルの溶液を除去した後、1%ノニデットP-40TM(ナカライテスク製)を100 μ l加え、接着によって残っている細胞を溶解させた。次いで、各ウエル中のBCECF-AM量をフルオロスキヤンを用いて測定し、これを指標にしてヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)のフィブロネクチンに対する接着率を求めた。接着率は、フィブロネクチンをコートしていないウエルを用いて上記試験を行った場合の蛍光強度を0%とし、上記におけるBCECF-AMを取り込ませたヒトB細胞リンパ腫(RPMI8866)(1 \times 10⁵個)を1%ノニデットP-40TM100 μ lに溶解させた場合の蛍光強度を100%として算出した。

【0024】なお、対照として、抗ヒトインテグリン β 1抗体(SG/19)、抗ヒトインテグリン α_4 抗体(SG/73、順天堂大学医学部免疫学教室から入手)および抗体非添加の場合における接着率も上記と同様に求めた。

【0025】(3)試験結果

50 結果を図1に示した。図1から明らかなように、本発明

のモノクローナル抗体は、ヒトB細胞リンパ腫(RPMI 8866)のフィブロネクチンに対する接着を抑制することが判明した。

【0026】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明を説明する。

【0027】なお、実施例においては、以下の①-③の培地を目的に応じて使用した。

①RPMI 1640培地

②細胞(骨髓腫細胞またはハイブリドーマ)用培地

上記①の培地に以下のものを添加した培地

10% ウシ胎児血清

2mM L-グルタミン

50μM 2-メルカプトエタノール

100 U/ml ペニシリンG

100 μg/ml ストレプトマイシン

20mM 炭酸水素ナトリウム

③HAT培地

上記②の培地に更に、以下のものを添加した培地

0.1 mM ヒポキサンチン

0.4 μM アミノプテリン

16μM チミジン

【0028】実施例1

ヒトインテグリンβ₁を特異的に認識するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ:

(抗原の調製)種々のヒトリンパ細胞(6×10⁶個)を三分し、夫々50μlのPBSに懸濁した。そのうちの1つには抗ヒトインテグリンα₄抗体(SG/17)を、もう1つには抗ヒトインテグリンβ₁抗体(SG/19)を夫々1μgずつ添加し、残り1つには何も添加せず、それらを4℃で30分間培養した。培養後、夫々をPBSで洗浄した後、ヤギ抗マウスIgG-FITC(オリンパス製)0.5 μlを含有するPBS50μlに懸濁した。次いで、再度4℃で30分間培養し、PBSで洗浄した後、それらをPBS 200μlに再懸濁した。各懸濁液をフローサイトメトリーにより分析し、ヒトインテグリンα₄を発現しているがヒトインテグリンβ₁を発現していない細胞を選出し、ヒトB細胞リンパ腫であるRPMI 8866を得た。

【0029】得られたRPMI 8866(3×10⁶個)を可溶化バッファー[50mM トリス塩酸、pH 7.6、150 mM 塩化ナトリウム、1%ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、50mM ヨードアセトアミド、2mM 塩化マグネシウム、2mM 塩化カルシウム、0.1%アジ化ナトリウム、1mM フッ化フェニルメチルスルホン]30mlにより可溶化し、抗ヒトインテグリンα₄抗体(SG/17)をセファロースビーズに結合させたイムノアフィニティカラムに吸着させた。次いで、0.1 M グリシン塩酸バッファー(pH 3.0)で溶出し、ヒトインテグリンα₄β₁のヘテロダイマーを含む画分を得た。得られた画分を、蒸留水にて一夜透析した後、凍

結乾燥させた(収量10μg)。該凍結乾燥品をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法に付し、120-150 kDa にヒトインテグリンα₄β₁の存在を確認した。

【0030】(ハイブリドーマの製造)上記により得られたヒトインテグリンα₄β₁のヘテロダイマーの凍結乾燥品10μgを0.5 mlのPBSに溶解し、1~2週間間隔でアルメニアハムスターの腹腔内に5回注射して免疫した。

【0031】最終免疫の4日後にハムスターの脾臓を摘出して抗体産生脾細胞を調製した。次いで、該脾細胞とマウス骨髓腫細胞P3×63Ag8U.1(ATCC CRL 1597)を5:1の割合で混合し、50%ポリエチレングリコール(平均分子量4000)を用いて37℃で2分間反応させることにより細胞融合を行った。

【0032】細胞融合を行った細胞を96ウエルマイクロタイタープレートに植え込み、HAT培地にて37℃、5%炭酸ガス条件下で7~14日培養を行った。

【0033】次いで、増殖した細胞の培養上清についてフローサイトメトリー分析法によりスクリーニングを行った。フローサイトメトリー分析法の詳細は、以下の通りである。

【0034】160 μlのヒトインテグリンβ₁ハイブリドーマ培養上清を二分し、半分は2×10⁵個のRPMI 8866と共に、残り半分はヒトインテグリンβ₁を有しない2×10⁵個のRamos細胞(ATCC CRL 1596)と共に4℃で30分間培養した。PBSで洗浄後、0.5 μlのヤギ抗ハムスターIgG-FITC(CALTAG製)を含む50μlの細胞用培地中に4℃で30分間細胞を再懸濁し、そして再びPBSで洗浄した。それらを200 μlの細胞用培地に再懸濁し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0035】この結果、4クローンが目的の抗原に対し陽性を示すことが判明した。

【0036】上記スクリーニング工程で得られた4クローンをそれぞれ、BALB/cマウスの胸腺細胞(約1×10⁶個/ml)を含む細胞用培地で1個/0.2 mlとし96ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに植え込んだ。37℃、5%炭酸ガス条件下で培養後7~14日で、肉眼で認められるコロニーが形成された。こうして得られたコロニーについて上記と同様にスクリーニングおよびクローニングを行い、最終的にβ₁ペプチドに対するウサギ抗血清(アメリカ、ハーバードメディカルスクール、Michael B. Brenner博士から入手)を用いてウエスタン・ブロッティングによる確認操作を行い、ヒトインテグリンβ₁を特異的に認識する単クローン株を得た(120kDのβ鎖の部位に発色を認めた)。

【0037】得られた単クローン株は「抗ヒトインテグリンβ₁モノクローナル抗体(TN114)産生ハイブリドーマ」と表示し、工業技術院微生物工業技術研究所に寄託した[受託番号、微工研菌寄第13202号(F

7

ERM P-13202)】。

【0038】実施例2

ヒトインテグリン β_7 を特異的に認識するモノクローナル抗体：予め2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン（ナカライテスク製）0.5 mlを腹腔内投与したBALB/cマウス（3匹）に対し、実施例1で得られた抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体（TN114）産生ハイブリドーマ（ 1×10^7 個）を腹腔内に接種した。約1週間後にハムスター抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体（TN114）を含む腹水（約3 ml/マウス）を得た。

【0039】次に、得られた腹水約10 mlにPBS 20

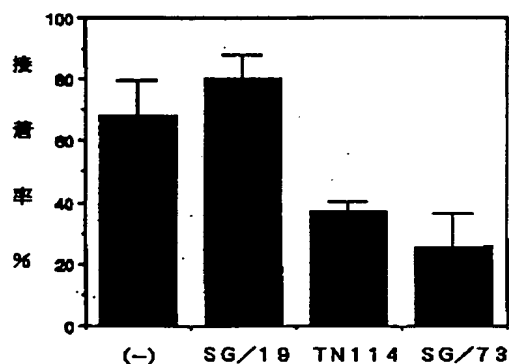
8

mlを加え、4℃においてPBSで1夜透析した。これを0.2 μ mのフィルターに通した後、プロテインGセファロース4ファーストフロー（ファルマシア製）カラムで分離精製し、再び、4℃においてPBSで1夜透析し、ハムスター抗ヒトインテグリン β_7 モノクローナル抗体（TN114）のPBS溶液5 mlを得た（濃度：100 μ g/ml）。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のモノクローナル抗体（TN114）がヒトB細胞リンパ腫（RPMI8866）のフィブロネクチンに対する接着を抑制することを示す図である。

【図1】



フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

識別記号

片内整理番号

F I

技術表示箇所

//(C 1 2 P 21/08

C 1 2 R 1:91)

(C 1 2 N 5/20

C 1 2 R 1:91)

(72)発明者 八木田 秀雄

東京都板橋区小豆沢3丁目9番2-610号

(72)発明者 奥村 康

千葉県千葉市中央区松波1丁目14番9号